

3/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007713065

WPI Acc No: 1988-346997/198849

XRAM Acc No: C88-153333

Agents for selective adsorption of biopolymers - e.g. nucleic acids, consisting of an adsorbent bound to a solid carrier by an adhesive layer

Patent Assignee: DIAGEN INS FUR MOLE (DIAG-N)

Inventor: COLPAN M; PIOTROWIAK R

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3717209	A	19881201	DE 3717209	A	19870522	198849 B
DE 3717209	C	19910228				199109

Priority Applications (No Type Date): DE 3717209 A 19870522

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3717209	A	5		

Abstract (Basic): DE 3717209 A

New agents for the selective adsorption of biopolymers from a mixt. of biopolymers onto a carrier-bound material consist of (a) an extensive, solid carrier, (b) an adhesive layer, and (c) a material which adsorbs the biopolymers.

The adhesive forming the adhesive layer is pref. a thermoplastic adhesive. The extensive, solid carrier may consist of inorganic and/or organic material and is pref. a plastic foil, Eppendorf reaction vessel, pipette tip, microscope slide, microlitre plate, cannula, nylon filter and/or plastic tubs. The biopolymer-adsorbing material is pref. silica gel, a synthetic organic or inorganic polymer, aluminium oxide, titanium dioxide, agarose, cellulose, hydroxyapatite and/or acrylamide, the surface of the adsorbent pref. being modified by ion-exchanger groups, affinity ligands or chelating agents.

USE/ADVANTAGE - Selective adsorption of biopolymers (pref. nucleic acids and/or proteins) in connection with e.g. molecule biological laboratory practice, biotechnological process application and medical diagnosis. The agents can also be used for the adsorptive immobilisation of biopolymers in order to subject them to a chemical modification.

0/0

Abstract (Equivalent): DE 3717209 C

An immobilised adsorbent for biopolymers comprises one or more selective adsorbents (e.g. silica gel, alumina, titania, cellulose, agarose, hydroxyapatite, polyacrylamide, etc.) bonded to an inert solid substrate with one or more thermoplastic adhesives (e.g. melt adhesives based on polypropylene and/or polybutene). USE - The prods. facilitate the sepn. of biopolymers, esp. biologically active biopolymers.

(5pp

Title Terms: AGENT; SELECT; ADSORB; BIO; POLYMER; NUCLEIC; ACID; CONSIST; ADSORB; BOUND; SOLID; CARRY; ADHESIVE; LAYER

Derwent Class: A96; B04; D16; J04

International Patent Class (Additional): B01J-020/28; C07H-001/06; C07K-003/18; C07K-017/00; C12N-015/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-L04; A12-V03C2; A12-W11L; B04-B04A; B12-K04A; D05-H10; D05-H13; J01-D01; J01-D01A; J04-B01C

Plasdoc Codes (KS): 0013 0211 0231 3151 0242 0251 0258 0619 1279 1283 1588
1982 1990 2002 2014 2307 2317 2318 2381 2393 2419 2423 2437 3317 2482
2488 3240 2499 2503 2513 2534 2541 2569 2585 2651 2654 3252 2682 2702
3264 3265 2706 2718 2726 3267 2729 3272 2733 2768 3288

Polymer Fragment Codes (PF):

001 014 028 034 04- 041 046 047 050 051 074 076 086 141 147 198 231 240
252 253 28& 303 31- 316 328 332 336 393 397 402 404 414 42- 431
433 435 443 445 446 466 472 477 489 53& 532 533 54& 55& 57& 575 58&
583 589 592 593 596 597 600 609 623 624 642 643 645 666 674 688 720
721 726

Chemical Fragment Codes (M1):

01 J011 J221 J581 K421 L560 M210 M211 M262 M280 M281 M320 M423 M720
M903 N131 N133 N135 N153 Q233 Q331 Q431 V714 V734 V743 V752 V753
V793

Derwent Registry Numbers: 0273-U; 1544-U; 1544-U; 1694-U; 1852-U; 1966-U;
1966-U; 2035-U

?

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 Patentschrift
①1 DE 37 17 209 C2

②1 Aktenzeichen: P 37 17 209.3-43
②2 Anmeldetag: 22. 5. 87
④3 Offenlegungstag: 1. 12. 88
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28. 2. 91

(3)

⑤1 Int. CL 5-68
B 01 J 20/28
B 01 J 20/10
B 01 J 20/26
B 01 J 20/06
B 01 J 20/24
C 07 K 3/18
C 07 K 17/00
C 07 H 1/06
C 12 N 15/00

DE 37 17 209 C2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

⑦4 Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

⑦2 Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4006 Erkrath, DE; Piotrowiak,
Ralf, Dr., 4010 Hilden, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-OS 24 29 196

⑤4 Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren, ein Verfahren zur Herstellung dieses Mittels und dessen
Verwendung

DE 37 17 209 C2

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren aus einem Gemisch von Biopolymeren an ein trägergebundenes Material, ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mittels sowie seine Verwendung.

In der molekularbiologischen Laborpraxis, biotechnologischen Verfahrensanwendung und in der medizinischen Diagnostik stellt sich häufig das Problem, daß aus einem Gemisch unterschiedlichster Moleküle eine bestimmte Stoffklasse wie Nukleinsäuren oder Proteine isoliert werden soll. Bekannt sind Verfahren, die sich in ihrem methodischen Aufwand sowie in der erzielbaren Reinheit des isolierten Stoffes beträchtlich unterscheiden. So liefert zum Beispiel die Säulenchromatographie mit Ionenaustauschern in der Regel hochgereinigte Fraktionen. Diese Reinigungsverfahren bedürfen aber eines großen methodischen und apparativen Aufwands (zum Beispiel HPLC-Apparaturen). Ist die Reinigung einer Vielzahl separater Proben notwendig, wie beispielsweise bei der DNS-Analyse rekombinanter Bakterienklone, DNS-Analysen von Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik und automatisierte Nukleinsäureisolierung, wird eine derartige Methodik zu aufwendig. Hinzu kommt, daß die mehrmalige Verwendung einer Säule für die Reinigung verschiedener Präparate zu Kontaminationen führt, die gerade im biologisch/medizinischen Bereich höchst unerwünscht sind.

Die DE-OS 24 29 196 betrifft mit Cyanogenbromid chemisch modifizierte anorganische Materialien. Dieses aktivierte Material bindet Peptide und Proteine vorzugsweise über Aminogruppen kovalent und irreversibel.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Mittel bereitzustellen, das die einfache Vorbereitung und Weiterverarbeitung von Proben gewährleistet, wobei die Proben Biopolymere, insbesondere Nukleinsäure und/oder Proteine enthalten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Mittel, bestehend aus

- a) einem flächenhaften festen Träger,
- b) einer Klebstoffschicht und
- c) einem Material, das die Biopolymeren reversibel adsorbiert.

Der mit dem Material gemäß DE-OS 24 29 196 erzielte Zweck unterscheidet sich von dem erfindungsgemäßen gravierend. Während gemäß der Erfindung Biopolymere selektiv und reversibel adsorbiert werden, einmal um sie aus dem Gemisch zu entfernen, zum anderen um an ihnen Reaktionen durchzuführen, wird bei dem Material gemäß der DE-OS 24 29 196 bezweckt, Biopolymere, wie Enzyme, kovalent und irreversibel zu binden, um mit diesen Molekülen Reaktionen an Substraten, die in einer Lösung die immobilisierten Biopolymere passieren, auszuführen. Üblicherweise werden solche Materialien in Säulen oder Behälter gefüllt und dann entweder im Durchflußverfahren oder im "Batch"-Verfahren mit den umzusetzenden Substraten in Verbindung gebracht.

Der Klebstoff fixiert das die Biopolymere adsorbierende Material (Adsorbentien) auf flächigen Trägermaterialien. Die Fixierung der Adsorbentien erfolgt durch einen Klebstoff, vorzugsweise einen Schmelzkleber auf der Basis von Polypropylen und Polybutylen, welcher vorher auf die entsprechende Oberfläche aufgebracht

wird. Als besonders geeignet haben sich thermoplastische Klebstoffe, zum Beispiel ein amorphes alpha-Olefin-Copolymer (Vestoplast®-508), erwiesen, da sie technisch leicht zu verarbeiten sind, die Fixierung in chemischer Hinsicht unterschiedlichster Partikel gestatten und aufgrund der Unlöslichkeit in wäßrigen Lösungen nicht zu Kontaminationen der Probe führen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Klebstoffe können durch Erhitzen verflüssigt werden und entwickeln erst dann ihre klebenden Eigenschaften. Die Temperatur der Thermobehandlung des Klebstoffes liegt zwischen 60 und 180°C, vorzugsweise bei 70 bis 120°C. Der Klebstoff wird zum Auftragen auf den festen flächenhaften Träger in Form eines einseitig oder zweiseitig offenen Behälters (Reaktionsgefäß, Schlauch und ähnliches) zunächst in Chloroform oder Methylenchlorid gelöst oder suspendiert (0,05 bis 0,5 g/ml, vorzugsweise 0,1 bis 0,3 g/ml Chloroform oder Methylenchlorid). Danach gibt man diese Suspension in das Gefäß. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Klebstoff und Gefäßwand wird die Gefäßwandung mit Klebstoff beschichtet. Dann dekantiert man die überschüssige Suspension ab.

Die jeweiligen Adsorbentien werden aufgetragen, im einfachsten Fall durch Bestreuen der Gefäßwand, und bei einer Temperatur von 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C prozessiert, so daß die Adsorbentien mittels Klebstoff an der Gefäßwand haften. Dabei ist es gleichgültig, aus welchem Material das Adsorbens besteht. Es können sowohl oberflächenmodifizierte Materialien auf der Basis von Kieselgel, Aluminiumoxid, Titanoxid, Agarose, Cellulose, Hydroxylapatit, Acrylamid und andere unlösliche Adsorbentien eingesetzt werden. Die Art der Oberflächenmodifizierung spielt dabei ebenfalls keine Rolle; Ionenaustauscherguppen enthaltende Adsorbentien können ebenso verwendet werden wie beispielsweise Affinitätsadsorbentien oder Chelatbildner.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren fixierten Adsorbentien stellen eine grundsätzlich neue Anwendungsform dar und bieten die Möglichkeit neuer und im Vergleich zur üblichen Methodik einfacher Verfahren. Das fixierte adsorbierende Material wird lediglich mit einer die zu trennenden Substanzen enthaltenden Lösung überschichtet und eine bestimmte Zeit inkubiert. In Abhängigkeit von den Lösungsbedingungen binden bestimmte Moleküle aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen reversibel an chemische Gruppen des Adsorbens. Nach der Bindung wird die verbliebene Lösung dekantiert. In einem Waschvorgang wird durch erneutes überschichten und Dekantieren das Adsorbens von unspezifisch gebundenen und abzutrennenden Substanzen gereinigt. In einem abschließenden Elutionsschritt wird eine Lösung zugesetzt, die zur Freisetzung der gebundenen Moleküle führt.

Als Adsorbentien kommen Materialien wie synthetische, organische und anorganische Polymere, Kieselgel, Aluminiumoxid, Titanoxid, Cellulose, Agarose, Hydroxylapatit, Acrylamid und andere unlösliche Adsorbentien in Betracht, wobei diese Materialien meist oberflächlich modifiziert sind. Vorzugsweise kann die Modifikation aus chemischen Gruppen bestehen, die Ionenaustauscherguppen aufweisen oder die Möglichkeit zur Immobilisierung von Affinitätsliganden besitzen oder bereits mit Affinitätsliganden beladene Adsorbentien sind. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Oberfläche des Trägermaterials mit Chelatbildnern modifiziert.

Auch sogenannte "reversed phase"-Materialien kön-

nen für bestimmte Applikationen wie Entfernung von hydrophoben Bestandteilen eines Gemisches verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Adsorbentien, die bekannt sind aus DE-OS 32 11 309 sowie in der deutschen Patentanmeldung der Anmelderin P 36 27 063 vorgeschlagen werden. Die Partikelgröße beträgt 1 µm bis 2 mm. Die Porengröße beträgt 5,0 bis 2500 nm, vorzugsweise 150 nm. Das in Form von Partikeln vorliegende, oberflächlich modifizierte Adsorbens wird, wie oben beschrieben, mittels eines thermoplastischen Klebstoffs an den flächenhaften festen Träger gebunden, der aus organischem und/ oder anorganischem Material besteht. Der flächenhafte Träger kann in bevorzugten Ausführungsformen bestehen aus Folien, Filtern, Schläuchen, Gefäßen oder Platten aus Kunststoffen, Glas, Keramik etc. Weitere bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Mittels sind Arbeitsgefäße, wie Reaktionsgefäße aus Kunststoff, z. B. Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäße) Pipettenspitzen, Objektträger, Mikrotiterplatten, Kanülen, Nylonfilter und ähnliches.

Der Anwendungsbereich des erfindungsgemäßen Verfahrens ist außerordentlich breit. Beispielhaft seien genannt: Plasmidpräparationen, Isolierung langkettiger, chromosomaler DNS aus unterschiedlichsten Quellen, Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren unterschiedlichster Provenienz sowie Immobilisierung von Proteinen, insbesondere Immunglobulinen sowie Reinigung von spezifischen Antigenen durch Affinitätsadsorption. Außerdem ist es möglich, das erfindungsgemäße Mittel zur adsorptiven Immobilisierung von Biopolymeren zu verwenden, um diese einer chemischen Modifizierungsreaktion zu unterziehen. So können beispielsweise Nukleinsäuren in adsorbiertem Zustand mit Enzymen, beispielsweise Restriktionsenzymen behandelt werden. Auch eine Behandlung mit Polymerasen sowie radioaktive Markierung mittels Nicktranslationen, Endmarkierungen mit Klenow-Polymerasen, Methylierungen, Phosphatasebehandlungen und ähnlichen Reaktionen der Nukleinsäurebiochemie sind mit dem erfindungsgemäßen Mittel in überraschend einfacher Weise möglich. Mit dem erfindungsgemäßen Mittel gelingt es, einen partiellen Nukleinsäureabbau reproduzierbar zu erreichen, ohne zunächst eine aufwendige Enzymkinetik erstellen zu müssen um die Abbaureaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt zu stoppen. Überraschenderweise stoppt nämlich der Nukleinsäureabbau in reproduzierbarer Weise nach einer gewissen Anzahl von Restriktionsschnitten. Damit entfällt die mühsame Vorgehensweise, die bei Anwendung herkömmlicher Methoden zwingend erforderlich ist. Das Verfahren ist Gegenstand einer gleichzeitig mit dieser Patentanmeldung eingereichten Patentanmeldung.

Es ist auch möglich, zuerst ein Biopolymer, das eine gewisse Affinität zu anderen Biopolymeren aufweist, an dem betreffenden Adsorbens zu immobilisieren, wonach dann das eigentlich zu untersuchende oder gewinnende Biopolymere in Form eines Sekundärkomplexes an den primären Komplex gebunden wird. So weist zum Beispiel Protein A eine starke Affinität zu Immunglobulinen (IgG) auf. Immobilisiert man also Protein A an dem Biopolymere adsorbierenden Material, wird man in die Lage versetzt, die IgG-Fraktion aus einer Probe selektiv zu adsorbieren.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Die Kopplung der Partikel an den festen flächenhaften Träger erfolgt mit einem amorphen Olefin-Copolymer zur Herstellung von Schmelzklebern (Vestoplast®-508).

Um das Reaktionsgefäß mit einer einheitlich dicken Schicht von etwa 20 µm mit dem Klebstoff zu beschichten, wird zunächst das amorphe Olefin-Copolymer zur Herstellung von Schmelzklebern (Vestoplast®-508) in Chloroform suspendiert (0,15 g/ml), so daß eine kolloidale Suspension entsteht. Diese Klebstoffsuspension wird in das Reaktionsgefäß gegeben und sofort wieder dekantiert. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen dem Material des entsprechenden festen flächenhaften Trägers und dem Klebstoff verbleibt ein dünner Film an der Innenwandung des Gefäßes. Durch Unterdruck (5 Minuten im Exsikkator) wird anschließend das Chloroform entfernt. Die zu fixierenden Partikel, zum Beispiel Anionenaustauscher wie Fractogel TSK DEAE-650, Ionenaustauscher, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 und bekannt aus DE-OS 32 11 309, mit Partikelgrößen von 50 bis 1000 µm und Durchmesser der Poren mit dem 1- bis 20-fachen des Durchmessers des zu trennenden Moleküls, werden in das Gefäß gefüllt, welches anschließend auf ca. 74°C erhitzt wird und dabei seine klebenden Eigenschaften entwickelt. Nach dem Abkühlen werden nicht fixierte Partikel mittels Druckluft durch Wegblasen entfernt.

Beispiel 2

Mit dem amorphen Olefin-Copolymer zur Herstellung von Schmelzklebern (Vestoplast®-508) kompatible Folien können direkt beschichtet werden, indem der thermisch verflüssigte Klebstoff aufgetragen wird und mittels einer Roll- oder Schlitzrakel ein homogener Film der jeweils gewünschten Schichtdicke aufgezogen wird. Die Fixierung erfolgt auch in diesem Fall durch Erwärmung des Klebers in Gegenwart der Partikel.

Beispiel 3

Kanülen und Pipettierspitzen werden beschichtet, indem die Klebstoffsuspension eingezogen, sofort wieder herausgedrückt und nach Einfüllen der jeweiligen Partikel, zum Beispiel gemäß der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3, DE-OS 32 11 309 oder anderer Ionenaustauscher erhitzt wird. Ungebundene Partikel werden mittels Druckluft durch Wegblasen entfernt.

Gemäß den Beispielen 1 bis 3 können die folgenden Materialien zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mittels eingesetzt werden: Ionenaustauscher auf Silicagel-/Agarose-/Acrylamid-/Cellulose-Basis, wie DE-52 und TSK DEAE-650. Das Material muß mit Wasser und Aceton vorher gewaschen und im Vakuum getrocknet werden. Auch handelsübliche Reversed-phase-Materialien Lichroprep® RP-18) sowie aktivierte Affinitätsadsorbentien, wie zum Beispiel hydrophile Acryl-Copolymerisate (Eupergit®-C) können eingesetzt werden.

Beispiel 4

Plasmidpräparation aus Escherichia coli mit Hilfe von mit Ionenaustauscher beschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäßen) nach Beispiel 1, wobei das in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagene Ionenaustauschermaterial

verwendet wird:

Der Bakterienaufschluß erfolgt nach der "Alkaline Lysis Method" (siehe Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87 969-136-0, New York). Anstelle der Phenolisierung wird jedoch der Überstand auf 1 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumacetat pH 7 eingestellt und in ein Reaktionsgefäß gegeben, wobei das Reaktionsgefäß gemäß Beispielen 1 bis 3 mit dem Ionenaustauscher bekannt aus der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 beschichtet wurde.

Nach 15 Minuten wird die Lösung dekantiert, das Reaktionsgefäß mit 2 x je 1 ml der angegebenen Pufferlösung gewaschen und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 x 100 µl Elutionspuffer (1,5 M Natriumchlorid, 50 mM Natrium-Acetat pH 7, 15% Ethanol) eluiert. Das Eluat wird mit 25 µl Wasser und 80 µl Isopropanol versetzt, 20 Minuten bei -70°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die so isolierte Plasmid-DNS ist in der Reinheit mit durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigten DNS-Proben vergleichbar. Sie kann erfolgreich enzymatischen Behandlungen unterworfen werden.

Beispiel 5

Isolierung langkettiger, chromosomaler DNS aus Gewebe mit Hilfe von mit Ionenaustauschern Mikrozentrifugenröhrchen beschichteten (Eppendorf-Reaktionsgefäßen) nach Beispiel 1, wobei der Ionenaustauscher in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagen wird:

Für den Zellaufschluß eukaryotischer Zellen existieren verschiedene Methoden (vgl. Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87 969-136-0, New York).

Sobald die Zellen lysiert sind, wird das von störenden Bestandteilen befreite Lysat (cleared lysate) auf 1 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumacetat pH 7 eingestellt und anschließend, wie in Beispiel 4 beschrieben, behandelt. Es können auf diese Weise extrem große DNS-Fragmente (50 bis 1000 kb) isoliert werden. Bei allen anderen Methoden, die zur Reinigung und Isolierung von DNS bekannt sind, wie Säulenchromatographie und phenolischer Aufschluß, kommt es aufgrund starker Scherkräfte zur Fragmentierung der Nukleinsäuren. Werden die nach Beispiel 1 hergestellten erfindungsgemäßen Mittel eingesetzt, unterliegen die Moleküle nur schwachen Diffusionskräften und nur geringfügigen Scherkräften.

Darüber hinaus bewirkt die rein oberflächliche Adsorption eine zusätzliche Stabilisierung der langen Moleküle, deren Länge 1 µm bis 3000 µm betragen kann.

Beispiel 6

Isolierung von Nukleinsäuren (BNYV-Virus) aus stark verschmutzten Quellen, zum Beispiel Erde, mit Hilfe von mit Ionenaustauscher beschichteten 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäßen (Reaktionsgefäße nach Beispiel 1 mit Ionenaustauscher versehen), die wie folgt durchgeführt wird:

Etwa 10 g Erde werden mit 10 ml 40 mM TRIS-Puffer, pH 7,5, 20 mM Natrium-Acetat und 1 mM EDTA sowie mit 10 ml wasser-gesättigtem Phenol versetzt und 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend werden 800 µl 25%iges Triton® X-100 und 10 ml Chloroform zugesetzt und nach Mischen 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wird mit 10 ml Chlo-

roform versetzt und erneut 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird nun auf 300 mM Natriumchlorid eingestellt und die beschichteten Reaktionsgefäße gegeben.

Die Bindung von Nukleinsäuren erfolgt während 40 Minuten bei 40°C. Anschließend wird der Überstand dekantiert und verworfen und das Reaktionsgefäß 2 x mit wassergesättigtem Phenol und 2 x mit 50 ml 0,3 M Natriumchlorid gewaschen. Die Elution erfolgt 10 Minuten bei 1,5 M Natriumchlorid, 50 mM Natrium-Acetat pH 7 und 15% Ethanol. Das Eluat wird durch 1 Vol. Wasser und 20 ml Isopropanol 30 Minuten bei -20°C gefällt und abzentrifugiert. Darauf folgende Gelelektrophorese und DOT-BLOT-Analysen belegen eine wesentlich höhere Probenreinheit als es mit anderen Verfahren, wie zum Beispiel der Säulenchromatographie, erreichbar ist.

Beispiel 7

Immobilisierung von Protein A und Reinigung von Human Immunglobulinen (IgG) mit Protein A-Affinitätsadsorption:

Ein mit aktiviertem Silicagel beschichtetes Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) wird mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gefüllt und 1 mg Protein A (aus *Staphylococcus aureus* oder rekombinantes Protein A) gelöst in 100 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei 4°C geschüttelt, um eine hohe Immobilisierung von Protein A zu gewährleisten. Nach der Reaktion wird das nicht immobilisierte Protein A pipettiert und das Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) 2 x mit je 500 µl 0,1 molar Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen. Die nicht reagierten aktiven Gruppen werden blockiert durch zweistündiges Schütteln mit 250 µl 0,05 M Mercaptoethanol in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0. Nach der Blockierungsreaktion wird das Produkt 5 x mit 500 µl 0,1 molar Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Das mit Protein A beschichtete Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) wird mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, und 1 ml 0,05 M Natriumcitratpuffer, pH 3,0, gewaschen und 2 x mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Die IgG-Probe, bestehend aus 1 mg rohem human IgG, wird in 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gelöst, in das mit Protein A beschichtete Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) pipettiert und 30 Minuten bei 10°C geschüttelt und adsorbiert. Verunreinigungen mit anderen Proteinen und unspezifisch gebundenes IgG werden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene human IgG mit 2 x 100 µl 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, eluiert.

Die Bindekapazität von mit Protein A beschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäßen) wurde zu je 200 µg IgG bestimmt.

Beispiel 8

Immobilisierung von Maus anti-human IgG und Reinigung von Human Immunglobulinen (IgG) mit Maus anti-human IgG-Affinitätsadsorption:

Ein mit aktiviertem Silicagel beschichtetes Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) wird mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gefüllt und 1 mg Maus anti-human IgG gelöst in 100 µl 0,1 M Natri-

umphosphatpuffer, pH 8,0, zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei 4°C geschüttelt, um einen hohen Immobilisierungsgrad von Maus anti-human IgG zu gewährleisten.

Nach der Reaktion wird das nicht immobilisierte Maus anti-human IgG pipettiert und das Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) 2 × mit je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen. Die nicht abreagierten, aktiven Gruppen werden blockiert durch zweistündiges Schütteln mit 250 µl 0,05 M Mercaptoethanol in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0.

Nach der Blockierungsreaktion wird das Produkt 5 × mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen.

Das mit Maus anti-human IgG beschichtete Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) wird mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 und 1 ml 0,05 M Natriumcitratpuffer, pH 3,0, gewaschen und 2 × mit je 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert.

Die IgG-Probe, bestehend aus 1 mg rohem human IgG, wurde in 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gelöst, in das mit Maus anti-human IgG beschichtete Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) pipettiert und 30 Minuten bei 4°C geschüttelt und adsorbiert.

Verunreinigungen mit anderen Proteinen und unspezifisch gebundenes IgG werden durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene human IgG mit 2 × je 100 µl 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, eluiert. Die Bindekapazität von einem mit Maus anti-human IgG beschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäß) wurde zu 50 µg IgG bestimmt.

Beispiel 9

Nukleinsäuren können in adsorbiertem Zustand, insbesondere gebunden an Ionenaustauscher, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949,3 der Anmelderin, Fractogel TSK DEAE-650 und DE-52 Cellulose, nach den bekannten Verfahrensweisen (siehe Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN-0-87 969-136-0, New York) enzymatisch behandelt werden. Vor Zugabe des Enzyms empfiehlt sich die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA), 3 µg Plasmid, zum Beispiel pBR 322, die nach der oben beschriebenen Plasmidpräparationsmethodik isoliert worden sind und an einen Anionenaustauscher wie DE-52 Cellulose gebunden sind, werden mit Eco R 1 endonukleolytisch gespalten. Hierzu wird zunächst eine Rinderserumalbumin-Lösung (2 mg/ml Eco R I Puffer) in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach 10 Minuten wird diese Lösung dekantiert und verworfen. Mit 3 Einheiten Eco R 1 wird nun 30 Minuten in 100 mM Natriumchlorid, 50 mM TRIS, pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Dithiothreitol verdaut. Etwa 90 bis 95% der gesamten Plasmid-Spalstellen ist umgesetzt, wie sich nach Elution mit anschließender Gelelektrophorese nachweisen läßt.

Patentansprüche

1. Mittel zur selektiven Adsorption von Biopolymeren aus einem Gemisch von Biopolymeren an ein trägergebundenes Material, bestehend aus
 - a) einem flächenhaften festen Träger,
 - b) einer Klebstoffschicht und

c) einem Material, das die Biopolymeren reversibel adsorbiert.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der die Klebstoffschicht bildende Klebstoff ein thermoplastischer Klebstoff ist.

3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der flächenhafte feste Träger aus organischem und/ oder anorganischem Material besteht.

4. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des die Biopolymeren adsorbierenden Materials durch Ionenaustauschergruppen oder Affinitätsliganden modifiziert ist.

5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des die Biopolymeren adsorbierenden Materials mit Chelatbildnern modifiziert ist.

6. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß auf einen festen Träger eine Schicht aus thermoplastischem Klebstoff aufgebracht wird, wonach das Material, das die Biopolymeren adsorbiert, auf die Klebstoffschicht aufgetragen und bei erhöhter Temperatur behandelt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der feste flächenhafte Träger ein einseitig oder zweiseitig offener Behälter ist und

a) der Klebstoff in organischen Lösungsmitteln suspendiert aufgebracht,

b) das Lösungsmittel abdekantiert und nach Verdampfen des restlichen Lösungsmittels,

c) das Adsorbens eingefüllt und dann bei 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C behandelt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der flächenhafte Träger eine Folie ist und

a) der Klebstoff mit einer Roll- oder Schlitzrakel aufgebracht,

b) mit dem Adsorbens beschichtet und dann

c) bei 60 bis 180°C, vorzugsweise 70 bis 120°C behandelt wird.

9. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Adsorption, Trennung, Reinigung und/oder Isolierung von Biopolymeren.

10. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur chemischen Modifizierung von Biopolymeren.

11. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das die Biopolymere adsorbierende Material seinerseits ein am festen flächenhaften Träger immobilisiertes Biopolymeres ist, welches zu einem weiteren Biopolymeren eine Affinität besitzt.